

기름으로 오염된 토양에서 작물생육을 위한 계면활성제 생산 Bacteria의 활용에 관한 연구

황철원* · 장혜원 · 최용락¹한동대학교 기초학부(생명공학연구소), ¹동아대학교 생명자연과학부

Received May 28, 2007 / Accepted June 21, 2007

The Study of Application of Bio-Surfactant Producing Bacteria for Growing Crop in Oil Spilled Soil. Cher Won Hwang*, Hae Won Chang and Yong Lark Choi¹. School of Global Leadership (Institute of Bioscience and Technology), Han-Dong Global University, Pohang 791-708, Korea, ¹Department of Biotechnology, Faculty of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Busan 604-714, Korea – *Bacillus* sp.LP03 (producing emulsifying substances such as bio-surfactant) was used as a bio-control agent to degrade hydrocarbon (gasoline in oil spilled crop soil). The soil (brought from fertilizer store) was mixed with gasoline-spilled soil (made with Diatomaceous Earth, Sigma.U.S.A). The study was conducted for a period of 13 days, 13 days during which bacterial growth, hydrocarbon degradation and growth parameters of *Bacillus* sp.LP03 including shoot and root length were studied. We found that the effective of bacterial producing substance might bio-surfactants let the plants survive even more promote the growth of shoot and root length and showed antifungal activity against gray mold. Without the bacteria, they couldn't grow in oil-spilled soil not even survive. According to the results of the above experiments, we can see with following results, hydrocarbon in gasoline was reduced, day by day, then RNA dot blotting was done and it fit the results we had done. Finally, this Bacteria (producing bio-surfactant) were found to have effective bio-control agent for cropping in oil spilled soil and infected by gray mold.

Key words – Bio-surfactant, *Bacillus* sp. LP03, biodegradation, gasoline-spilled soil

서 론

Hydrocarbons에 의한 환경오염이 환경 오염의 70%이상 이 된다는 사실에 비추어 볼 때 hydrocarbon에 오염된 물과 soil sludge들의 정화는 매우 중요한 것으로 생각된다[7]. 몇몇 미생물들은 혼합물속에서 hydrocarbon을 탄소 원으로 이용할 수 있는 능력이 있어 hydrocarbon을 간단한 CO₂와 H₂O로 분해하는 능력을 가지고 있으며 이러한 미생물들은 대부분 해양이나 수중 환경의 침전물로부터 유래하는 것 들이다[3-5,9,13,15]. 또한 biodegradation에서 혼합배양의 효과는 Sorkhoh와 그의 동료들[11]이 실험한 oil로 오염된 모래시료에서 oil 분해 균 조성의 연속적인 변화를 관찰한 것으로 확인 되었다. 이러한 실험은 Venkateswatan and Harayama [16]등도 자연기름이 포함된 medium에서 sequential enrichments의 관찰결과를 보고하였고, 더불어 유류오염의 발생증가에 따른 해결책을 위해 hydrocarbon분해에 관한 많은 연구들이 진행되고 있다[6,14]. 이처럼 미생물이 hydrocarbon을 분해시킬 수 있는 능력을 갖고 있음은 실험실 수준에서 gas chromatography를 통한 대사물질의 검출[2] 또는 colony counting methods를 통한 미생물의 생육[10]등을 통하여 검토되고 증명되어왔다.

전행 연구에서 계면활성제를 생산하는 여러 개의 bacterial strains을 순수 분리하여 얻었고, 그들 중 *Bacillus* sp.LP03 라고 명명된 세균은 항 진균 활성을 가진 물질을 생산하고 작물의 생육을 촉진시킨다는 연구 결과를 발표하였다[1]. 본 연구에서는 이 균이 gasoline으로 오염된 토양에서 hydrocarbon의 biodegradation 정도를 검토하였고 오염된 토양에서 작물의 생육에 미치는 영향을 작물의 생육 정도로 검토하였다. 또한 cloning된 본 균의 계면활성 관련유전자[8]를 이용하여 본 균이 gasoline으로 오염된 토양에서의 성장과 관련 유전자산물의 발현을 Northern blotting 실험을 통해 확인하고 본 균의 오염토양에서의 Bio-control agent로서의 사용 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 Sample 준비

본 실험에 사용된 균 *Bacillus* sp. LP03(이하 LP03)은 이미 발표된 균주로[1] 배양온도 및 배지조건은 LB-broth (Gelix, Korea)를 사용하여 최적온도인 30℃에서 2일 동안 배양하여 사용 하였다.

본 포장실험에 사용된 토양은 비옥한 토양(Gold Soil)으로 시중 원예상가에서 구입하였으며 이렇게 구입된 토양 100g에 gasoline을 1%또는 2%의 비율로 혼합한 후 원예상가에서 구입한 구조토로 2분의1정도의 공간을 충전 하였으며 이렇

*Corresponding author

Tel : +82-54-260-1304, Fax : +82-54-260-1319

E-mail : chowon@handong.edu

게 준비된 gasoline 혼합 토양에 발아 상태로 유도한 완두콩(증류수에 하루 동안 침지)을 심은 후 배양된 균을 첨가하여 실험날짜에 따라 실험에 사용하였다. 모든 pot 실험은 실내의 자연상태에서 실시 하였으며 작물과 함께 gasoline이 포함된 pot는 gasoline의 자연손실로부터 보호하기 위하여 빛이 투과하는 비닐로 밀봉하였다.

균 수의 측정 및 작물생육 정도 파악

Gasoline으로 오염된 토양에 심어진 작물(완두콩) pot는 자연상태에서 13일 동안 배양하였다. 이때 2일간 30℃에서 배양된 균을 원심분리 후 3차 증류수에 현탁 후 접종 하였으며 pot의 duplicated sets중 하나는 각 2, 4, 6, 8, 10, 13일째에 총 bacteria의 수를 측정하고, 다른 하나는 hydrocarbon 분해 정도와 토양 속에 포함된 total RNA 추출에 사용하였다

Bacillus sp. LP03 균 수의 측정은 pot 에서 배양 날짜 별로 추출한 토양을 증류수에 현탁 한 후 LB-broth 액체배지에 배양하고 배양액에서 취한 균을 희석하여 LB agar plates 위에 도말 한 후 30 ℃에서 24시간 배양 후 모든 colonies 의 수를 계측하고 각 배양 날짜 별 계측 균 중 각각 5개의 colonies를 임의로 선택하여 P.C.R 법에 의해 LP03임을 확인 하였다. 시험에 사용된 작물인 완두콩(green gram)의 씨앗들은 시중 원예상가에서 구입하였으며 씨앗들을 증류수에 적셔주고 씨앗들로부터 부유물들을 제거하였다.

같은 크기의 씨앗들의 표면을 0.1% HgCl₂ 용액으로 2-3분 동안 멸균하고, 실험용 gasoline 혼합토양 pots에 심어 13일 동안 생육 시킨 후 뿌리와 줄기 길이를 관찰하였다.

Hydrocarbon 분해측정 및 total RNA의 분리

총 hydrocarbons양은 각 날짜 별 토양 samples을 취해서 toluene과 같은 부피로 섞어 토양에서의 hydrocarbon를 추출하였다. 추출한 hydrocarbon는 UV spectrophotometer를 사용하여 420nm 에서 확인하였다[12]. gasoline의 농도는 standard curve를 사용하여 토양 samples의 hydrocarbon의 양으로 판단하였고, 감소는 3일째 되는 토양 samples로부터 총 hydrocarbon의 차이에 의해 결정했다. 각 실험 날짜는 2, 4, 6, 8, 10, 13일로 하였다.

토양 samples로부터 총 RNA의 추출과 조절을 위해, 이 실험에 사용한 모든 실험도구는 0.1% diethylpyrocarbonate (DEPC)을 처리한 후 autoclave 하여 RNase를 제거하였다. 모든 물과 solutions는 0.1% (DEPC)를 처리하여 37℃에서 하룻밤 autoclave 하였으며 1 g의 토양 samples에 1 ml의 lysis buffer (10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA, 20% sucrose, 50 mM NaCl, 10 µg/ml proteinase K, 0.1% SDS)를 첨가하여 충분히 섞어 주고 난 후 samples은 1시간 동안 55℃에서 incubation하였다. 0.5 ml의 각 혼합액의 상등액에 1 ml의 easy-Blue™ total RNA extraction kit (iNtRon™, Korea)를 첨가

하고 이하 extraction kit에 준하여 RNA를 추출하였다.

Iturin gene의 발현 정도 측정

itu gene [8]의 발현양의 측정을 위해 Detector™ PCR DNA Biotinylation Kit (KPL, U.S.A)의 biotinylated probe를 사용하였으며 primers ItuF (5'-GAGCGATGCGATCTCCTTG-3')와 ItuR (5'-GGCGTGCAGTGACATTTTG-3')을 각 0.15 µM씩 0.1 µl의 *Bacillus*. sp LP03의 chromosome을 주형으로 하여 증폭시켰다. Probe 작성은 thermocycler (Px2 thermal cycler, Thermo Electron Co. U.S.A.)PCR기를 사용하였으며 생성된 probe 혼합액(200µl)는 AccuPrep® PCR Purification Kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 순수분리 하였다.

앞에서 추출한 RNA samples을 positive charged nylon membrane (Roche Diagnostics GmbH, UK) 2µl씩 올려놓고 RNA는 UV 254nm에서 10분 동안 membrane에 고정하였다. 그리고 작성된 *itu* gene (*iturin* D)을 probe하여 hybridization하였으며 과정은 RNA Detector™ Northern Blotting Kit (KPL, U.S.A.)에 준하여 사용하였다.

통계적 분석

각 토양 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 13 day 간격으로 각 처리당 2번 반복하여 처리하였으며 모든 수치의 결과의 측정된 값은 Microsoft® Excel 2002를 이용하여 평균값 및 표준 편차를 구하여 이를 그래프로 나타내었다.

결과 및 고찰

Hydrocarbon 분해측정 및 균의 증식

Gasoline 오염토양(2%)에서의 LP03 cell의 변화와 이에 따른 hydrocarbon분해 정도를 측정한 결과를 Fig. 1에서 나타내었다. 그림에서 보듯이 LP03의 cell수는 8일 동안 증가하였고 그 후 급격히 감소하였다. 이와 동시에 hydrocarbon의 감소 또한 cell수의 증가와 함께 감소됨을 보이고 있다. Bacteria를 처리하지 않은 토양에서 이 기간 동안 hydrocarbon 감소는 좀처럼 보이지 않았지만, 서서히 감소함을 보였으며 이는 혼합된 gasoline의 자연증발에 의한 결과인 것 같이 보이나 이에 대한 고찰은 좀더 상세한 실험에 의하여 할 것으로 사료된다. 특이한 것은 8일을 정점으로 LP03 cell의 수는 급격히 감소 하고 있음을 보여주는 것으로 이는 LP03이 gasoline 오염 토양 내에서 hydrocarbon 감소와 더불어 우점종의 위치를 상실한 것으로 사료되며 이러한 결과는 8일 이후의 hydrocarbon 감소가 거의 나타나지 않은 결과에서 예측할 수가 있다. 위의 결과는 도말한 plates의 각 colonies를 계수 한 후 colonies를 다시 PCR에 의해 *Bacillus* sp. LP03임을 확인 하여 통계 처리한 결과이다. 따라서 LP03 처리에 의한 hydrocarbon 감소 8일째 되는 날을 정점으로

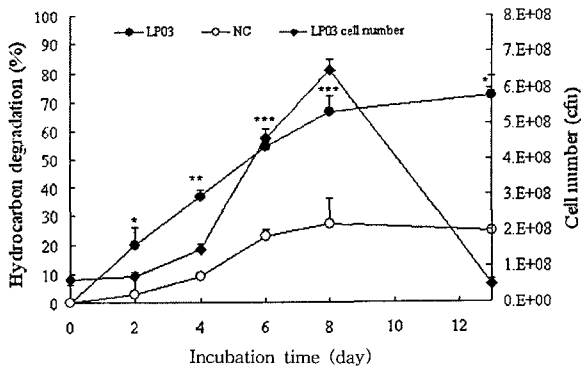


Fig. 1. Bacterial(LP03) growth and hydrocarbon degradation in various treated soil during 13 day ● The hydrocarbon degradation activity with LP03, ○ The hydrocarbon degradation activity without LP03, only distilled water, ◆ The cell number of LP03 in the gasoline contaminated soil

감소가 빠르게 진행됨을 확인 하였으며 hydrocarbon오염 토양에서의 본 균의 적용 가능성을 시사하였다.

Gasoline 오염 토양에서 hydrocarbon 분해효소(계면활성제)의 유전자발현

Gasoline오염된 토양에서 LP03을 처리하여 접종하였고, 28℃에서 10일 동안 배양한 후 격일로 total RNA를 토양 1g에서 추출하여 biotinylated probe로 *itu* gene 발현을 검출하였다. Fig. 2에서 보듯이 hydrocarbon분해효소 Iturin유전자의 발현양은 토양 1g 속의 균의 양이 증가함에 따라 유전자의 발현양은 배양 후 8일째에 정점에 달했으며 10일 이후에는 유전자의 발현 양이 급격히 감소함을 알 수 있었다. 이는 Fig. 1의 결과와도 일치하는 것으로 LP03의 hydrocarbon 분해 능이 8일을 기준으로 급격히 감소함은 오염토양에서 균수의 감소에 따른 것으로 확인 할 수 있었다.

Gasoline 오염토양에서의 작물생육에 미치는 LP03의 효과

오염된 토양에서 LP03균이 작물의 생육에 미치는 영향을 확인하기 위해 gasoline이 각각 1%, 2%로 오염된 토양에 균을 배양하여, 증류수에 현탁 하고 시험작물로서 선택한 완두콩을 심은 pots에 분무하여 13일 동안 재배한 후 이들의 생육상태를 확인한 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

Fig. 3 (B)에서 보듯이 2%의 오염된 토양에서는 시험작물인 완두콩이 거의 생육 하지 못하고 있음을 알 수 있었다. 그

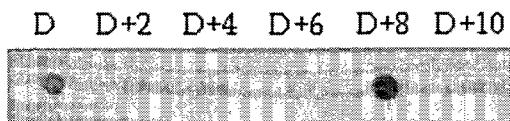
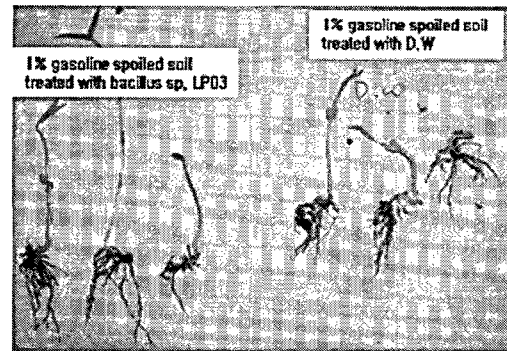
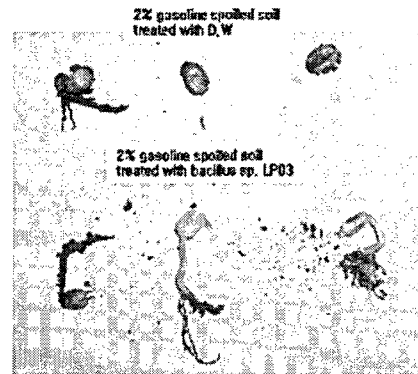


Fig. 2. Iturin(*itu*) gene expression in the gasoline spilled soil. D means the day that begins incubation of LP03



(A)



(B)

Fig. 3. Growth analyses of green gram in various gasoline spoiled soil. (A): The growth of green gram in 1% gasoline spoiled soil. (B): The growth of green gram in 2% gasoline spoiled soil.

러나 LP03을 처리한 구에서는 발아를 시작하여 성장 가능성을 보여 주었으며 1%의 오염된 토양(A)에서는 LP03을 처리한 구에서의 발아성장이 월등함을 알 수 있었다. 이는 Fig. 1에서 보았듯이 오염된 gasoline이 제거 되어 작물의 발아성장이 가능 함을 시사 하며 이러한 결과는 2%의 오염된 토양에서 13일이 지난 후에 시험작물이 썩어 있는 결과에서도 확인할 수 있었다.

이상의 결과는 본 균의 hydrocarbon 오염토양에서 hydrocarbon을 분해 한 후 작물의 생장을 가능케 함으로서 본 균의 적용과 사용을 확인 할 수 있었다.

요 약

Bacillus LP03 (계면활성제와 같이 유화물질을 생산하는)을 hydrocarbon을 감소시키는 bio-control agent로 사용했다. 토양 (시중구입)은 gasoline을 섞어 오염시킨 토양을 사용하였다. 13일 동안 bacteria의 성장, hydrocarbon의 감소, 그리고, *Bacillus* LP03의 작물 성장에 미친 요인(식물의 싹과 뿌리의 길이를 포함)을 관찰하였다. 우리는 이 bacteria의 hydrocarbon을 감소 시키는 물질로서 이 균이 생산하는 계

면활성제일 것이라는 가능성을 이미 확인 하였으며 이는 식물의 싹과 뿌리의 생장을 촉진하였고, 회색 곰팡이에 대하여 항진균 활성을 보였다. 본 연구에서는 bacteria를 넣지 않은 기름으로 오염된 토양 실험 군에서는 식물이 자라나지 않았을 뿐 아니라 살아남지도 못했다. 실험 결과로 볼 때, gasoline의 hydrocarbon이 시간이 지남에 따라 감소되었고, RNA blotting 실험에서는 오염된 토양에서 균의 증식과 더불어 계면활성제관련 유전자 산물의 증가를 확인하였다. 결과적으로, 이 bacteria (계면활성제를 생산하는)는 회색 곰팡이에 감염된 토양이나 기름으로 오염된 토양에서 작물이 자랄 수 있게 하기 위한 bio-control agent로서 유효한 균으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 농특 개발연구 사업(과제번호: 203067-03-HD120)의 일환으로 수행된 연구 과제이며 이의 지원에 감사드립니다.

참고 문헌

- Chang, H. W., Y. L. Choi, W. H. Ju, Y. H. Choi and C. W. Hwang. 2004. The antifungal activity and growth promotion effects of *Bacillus* sp. LP03, TBM40-3 on Pohang Buchu (Leeks). *Journal of Life Science* **14**(5), 859-862
- Fedorak, P.M. and D.W. Westlake. 1981. Microbial degradation of aromatics and saturates in Prudhoe Bay crude oil as determined by glass capillary gas chromatography. *Can. J. Microbiol.* **27**(4), 432-443.
- Hwang, K. A., J. R. Lee, S. J. Kim, Y. S. Kim and H. J. Ahn. 1999. Surface activity and environmental characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* JRT-4. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 159-165
- Kim, H. J., B. J. Kim, S. D. Ha, S. H. Hwang and J. Y. Kong. 1999. Degradation of crude oil and purification of biosurfactant from marine bacterium *Pseudomonas* sp. CHCS-2. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **14**, 192-197
- Kim, H. J., B. J. Kim, S. H. Hwang, D. J. Kim, H. W. Lee and J. Y. Kong. 1997. Degradation of crude oil and purification of biosurfactant from marine bacterium *Aeromonas* sp. BES-741. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **12**, 443-448
- Kim, S. J. and H. J. Yun. 1993. Isolation and identification of the crude oil-degrading psychrotrophic bacterium and the characteristics of OCT plasmid. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 66-73
- a) Lazar, I., A. Voicu, S. Dobrota, M. L. Stefanescu, G. Archir, I. G. Lazar, D. Mucenica and A. Balalia. 1995a. Microbial communities of soils, slops and waters contaminated with waste oil and phenols and their role in bioremediation of such environments. pp. 365-391 In: *Biohydrometallurgical Processing* (eds.), Vol. II.
- b) Lazar, I., A. Voicu, S. Dobrota, M. L. Stefanescu, G. Archir, I. G. Lazar, D. Mucenica, A. Balalia and C. Nicolescu. 1995b. Investigation on potential bacteria for the bioremediation treatment of environments contaminated with hydrocarbons. pp. 535-547 In: *Proceedings Volume of the Fifth Int. Conf. on MEOP and Related Biotechnology for Solving Environmental Problems* (eds.), Dallas, Texas.
- Lee, S. C., S. H. Kim, S. Y. Chung and Y. L. Choi. 2007. Isolation and Structural analysis of Bamylocin A, Novel Lipopeptide from *Bacillus amyloliquefaciens* LP03 having Antagonistic and Crude Oil-emulsifying Activity. *Archives Microbiology.* (in Press)
- Mibas, W. and D. L. Gutnick. 1993. Isolation, characterization, and sequences analysis of cryptic plasmid from *Acinetobacter calcoaceticus* and their use in the construction of *Escherichia coli* shuttle plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2807-2816
- Michael, A. H., P. F. James and C. E. Cerniglia. 1986. Naphthalene Biodegradation in Environmental Microcosms: Estimates of Degradation Rates and Characterization of Metabolites. *National Center for Toxicological Research, Food and Drug Administration.* Jefferson, Arkansas 72079
- Radwan, S. S., N. A. Sorkhoh, F. Fardoun and G. H. Al-Hasan. 1995. Soil management enhancing hydrocarbon biodegradation in the polluted Kuwaiti desert. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**(1-2), 265-270.
- Rahman, K. S. M., I. M. Banat, J. Thahira, Th. Thayumanavan and P. Lakshmanaperumalsamy. 2002. Bioremediation of gasollene contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. *Bioresource Technology* **81**, 25-32
- Rheinheimer, G. 1981. *Micrologie der gewalsser.* pp. 251. 3rd. ed. gustav fischer Verlag Verlag Stuttgart.
- Son, H. J., S. H. Go, G. Lee and S. J. Lee. 1996. Emulsification of crude oil by *Acinetobacter* sp. SH-14. *Kor. J. Microbiol.* **34**, 363-369.
- Suk, W. S., H. J. Son, G. Lee and S. J. Lee. 1999. Purification and characterization of biosurfactants produced by *Pseudomonas* sp. SW 1. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**, 56-61
- Venkateswaran, K. and S. Harayama. 1995. Sequential enrichment of microbial populations exhibiting enhanced biodegradation of crude oil. *Can. J. Microbiol.* **41**(9), 767-775.